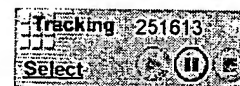


**DELPHION****RESEARCH****PRODUCTS****INSIDE DELPHION**
[Log Out](#) [Work Files](#) [Saved Searches](#)
[My Account](#)

Search: Quick/Number Boolean Advanced Der

**The Delphion Integrated View: INPADOC Record**Get Now: ☒ PDF | [File History](#) | [Other choices](#)

Tools: Add to Work File: Create new Work

View: Jump to: Top

Go to: [Derwent](#)☒ EmailTitle: **GB2209757B: ALTERED ANTIBODIES**Derwent Title: Modified IgG class antibody - having at least one aminoacid residue in the constant portion altered to alter an effector function ([Derwent Record](#))

Country: GB United Kingdom

Kind: B (See also: [GB2209757A](#))Inventor: GREGORY PAUL \* WINTER; 64 CAVENDISH AVENUE,CAMBRIDGE  
ALEXANDER ROBERT \* DUNCAN; 5 HARVEY ROAD,CAMBRIDGE  
DENNIS RAYMOND \* BURTON; 41 CARSICK HILL ROAD,SHEFFIELD S10Assignee: \* MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 20 PARK CRESCENT,LONDON W1N 4AL, United Kingdom  
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

Published / Filed: 1990-10-24 / 1988-11-01

Application Number: GB1988008825480

IPC Code: IPC-7: [A61K 39/395](#); [C12N 15/13](#);

ECLA Code: None

National Class: C3H0HB7M0000000000HB7MC3H0H6750000000000HB7MU1S0S2419

Priority Number: 1987-12-01 [GB1987008728042](#)INPADOC Legal Status: None Get Now: [Family Legal Status Report](#)

Designated Country: AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE AU EP GB JP US DE FR GB IT EP JP US

Family:

PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title
	<a href="#">WO8807089A1</a>	1988-09-22	1988-03-18	ALTERED ANTIBODIES
	<a href="#">WO8807054A1</a>	1988-09-22	1988-03-18	COMPLEMENT-BINDING PEPTIDE
	<a href="#">US5648260</a>	1997-07-15	1995-06-07	DNA encoding antibodies with altered eff functions
	<a href="#">US5624821</a>	1997-04-29	1995-06-07	Antibodies with altered effector functions
	<a href="#">JP03101690B2</a>	2000-10-23	1988-03-18	
	<a href="#">JP01502875T2</a>	1989-10-05		
	<a href="#">GB8825480A0</a>	1989-01-05		
	<a href="#">GB8825480A</a>	1989-01-05	1988-11-01	ALTERED ANTIBODIES
	<a href="#">GB8728042A0</a>	1988-01-06		

<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">GB8728042A</a>	1988-01-06	1987-12-01	ANTIBODY WITH ALTERED AFFINITY
	<a href="#">GB8718897A0</a>	1987-09-16		
	<a href="#">GB8706425A0</a>	1987-04-23		
<input checked="" type="checkbox"/>	<b>GB2209757B</b>	1990-10-24	1988-11-01	ALTERED ANTIBODIES
	<a href="#">GB2209757A1</a>	1989-05-24		
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">GB2209757A</a>	1989-05-24	1988-11-01	ALTERED ANTIBODIES
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">EP0351410A1</a>	1990-01-24	1988-03-18	COMPLEMENT-BINDING PEPTIDE
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">EP0307434B2</a>	1998-07-29	1988-03-18	ALTERED ANTIBODIES
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">EP0307434B1</a>	1993-09-08	1988-03-18	ALTERED ANTIBODIES
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">EP0307434A1</a>	1989-03-22	1988-03-18	ALTERED ANTIBODIES
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">DE3883899T3</a>	1999-04-22	1988-03-18	GEAENDERTE ANTIKOERPER.
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">DE3883899T2</a>	1994-03-31	1988-03-18	GEAENDERTE ANTIKOERPER.
	<a href="#">DE3883899C0</a>	1993-10-14	1988-03-18	GEAENDERTE ANTIKOERPER.
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">AU1480388A1</a>	1988-10-10	1988-03-18	ALTERED ANTIBODIES
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">AU0600575B2</a>	1990-08-16	1988-03-18	ALTERED ANTIBODIES
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">AT0094171E</a>	1993-09-15	1988-03-18	GEAENDERTE ANTIKOERPER.
25 family members shown above				

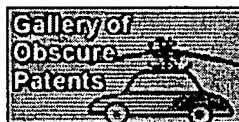
Forward  
References:

Go to Result Set: Forward references (1)

PDF	Patent	Pub.Date	Inventor	Assignee	Title
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">US7053202</a>	2006-05-30	O'Keefe; Theresa L.	Millennium Pharmaceuticals, Inc.	Immunoglobulin DNA c molecules, monobody c methods of production, methods of use therefor

Other Abstract  
Info:

CHEMABS 110(23)207251T CHEMABS 111(17)151930Q DERABS C88-285516 DER/285543



Nominate this for the Gallery...

Copyright © 1997-2006 The Tho

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact U](#)

⑤ 日本国特許庁(JP)

⑥ 特許出願

⑦ 公表特許公報(A)

平1-5

⑧ 公表 平成1年(1989)

⑨ Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	部門(区分)
C 12 P 21/00		C-6712-4B			
A 61 K 39/395		V-8829-4C			
C 07 K 15/08		8318-4H※			( )

⑩ 発明の名称 変性抗体の、または変性抗体に関する改良

⑪ 特 願 昭63-502461

⑫ 翻訳文提出日 昭63(1988)11月

⑬ 出 願 昭63(1988)3月18日

⑭ 国際出願 PCT/GB88/002

⑮ 国際公開番号 WO88/07089

⑯ 国際公開日 昭63(1988)9月

優先権主張 ⑰ 1987年3月18日 ⑱ イギリス(GB) ⑲ 8708425

⑳ 発 明 者 ウインター、グレゴリー・ポール イギリス、ケンブリッジ カベンディッシュ・アベニュー、6

㉑ 発 明 者 ダンカン、アレクサンダー・ロバート イギリス、ケンブリッジ ハービー・ロード、5

㉒ 出 願 人 メディカル・リサーチ・カウンシル イギリス、ダブリュ・1・エヌ 4・エイ・エル、ロンドン

㉓ 代 理 人 弁理士 塚見 久郎 外2名

㉔ 特 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許), US

最終頁に続く

請求の範囲

1. 応答部分(本明細書で定義する)中の少なくとも1つのアミノ酸残基が、非変成抗体と比較して抗体のニフェクター機能を変性する異なる残基により置換されたクラス1 g Gの変成抗体。

2. 抗体がエフェクター分子に対する親和性を非変成抗体と比較して変性した請求項1の抗体。

3. 抗体が正常抗体、モノクローナル抗体または多価抗体である請求項1の抗体。

4. 非変成抗体と比較してFcレセプターに対して変性した結合親和性を備えた変性Fc領域を有するクラス1 g Gの変成抗体。

5. 非変成抗体と比較してFcγR1レセプターに対し

て、残基285がG10により置換された請求項6の抗体

8. 残基234、286および237の少なくとも1つがYにより置換された請求項6の抗体。

9. 非変成抗体と比較してC1qに対して変性した結合性を備えた変性Fc領域を有するクラス1 g Gの変成抗体

10. 残基のアミノ酸残基18、320および222の少なくとも1つが、異なる側鎖を有する残基に代わった残基C2領域を有する請求項9の抗体。

11. 残基318、320および222の少なくとも1つがC1q結合親和性を減少するA1aに代えた請求項10の抗体。

12. 残基218がV11に代わった請求項10の抗体。

13. 残基322がQ1nに代わった請求項10の抗体。

域を有する請求項15の抗体。

16. 図29がA12により置換された請求項15の抗体。

17. げっ歯類またはヒトIgGからなる請求項1の抗体。

18. 変換部分(本明細書で定義する)の少なくとも1つのアミノ酸残基を異なる残基で置換し、抗体のエフェクター機能を非変換抗体と比較して評価することからなるエフェクター分子に対するクラスIgGの抗体のエフェクター機能を評価する方法。

19. (a) IgH鎖またはH鎖の変換部の少なくとも一部をコード化し、かつ少なくとも1つのアミノ酸残基が変換部抗体中の対応する残基と異なるDNA配列に作動可能に結合した適切なプロモーターを含む第一の複製可能な表現ベクターを生成し;

(b) 必要により、相補的IgL鎖またはL鎖をコード化するDNA配列に作動可能に結合した適切なプロモーターを含む第二の複製可能な表現ベクターを生成し;

(c) 第一または第二の表現ベクターを有する細胞系を構築し;

(d) 前記構築した細胞系を培養して変換抗体を生成す

## 明 細 書

変換抗体の、または変換抗体に関する改良

### 発明の分野

本発明は変換抗体に関し、変換したエフェクター機能を有する抗体、該抗体を産出する方法、および抗体のエフェクター機能を評価する方法に関する。

### 発明の背景

抗体、即ち免疫グロブリンは、ジスルフィド結合により連結された二つのH (heavy)鎖と、二つのL (light)鎖からなり、各鎖は各々の鎖にジスルフィド結合により結合している。IgGクラス(すなわち、ガンマ(G)クラスの免疫グロブリン(Ig))の抗体の一般構造を添付の図1図に模式的に示す。

各鎖は一対に一つの可変領域を有し、これに幾つかの定常領域が連なる。各鎖は一対に一つの可変領域を、他鎖に一つの定常領域を有し、L鎖の可変領域はH鎖の可変領域と隣接し、L鎖の定常領域はH鎖の最初の定常領域と隣接する。

る

工程からなる変換抗体に比較して改良したエフェクター機能を有するクラスIgGの抗体を生成する方法

えて伸びるH鎖の部分により構成されたFc領域に

抗体は、エフェクター分子の結合を媒介としてエフェクター機能を有する。例えば、補体のC1成分の誘発結合は補体システムを活性化する。補体の活性化は作用および細胞傷害の過程において重要な補体の活性化は炎症反応を刺激し、免疫応答の誘発を引き起こす。さらに、抗体は、抗体Fc領域上セプター部位を細胞上のFcレセプター(FcR)でFc領域を介して細胞に結合する。IgG(ガンター)、IgE(イグレセプター)、IgA(アセプター)およびIgM(ミューレセプター)を含むクラスの抗体に対して特定の幾つかのFcレセプターを有する。細胞表面のFcレセプターに対する抗体の抗体凝集粒子の食作用(eagulfosis)および破壊、その消化、ネラー細胞による抗体被覆した細胞の細胞毒性細胞障害(ADCC)と称される)、炎症、その放出、胎盤トランスファーおよび免疫グロブリンの細胞を介したその作用で必要な半減期の延長

提供され、ここで少なくとも一つの定常型のアミノ酸残基(本明細書にて炭素)は異なる位置により置換され、抗体のエフェクター機能を未成熟の抗体に比較して減性する。

抗体のエフェクター機能は減性、すなわち、Fcレセプターまたは補体成分のようなエフェクター分子に対する抗体の親和性の強化または減少により変性してもよい。結合親和性は一般的にエフェクター分子の結合部位を突触することにより度わり、この場合では、開鎖の部位の位置を認識し適当な方法で該部位の少なくとも一部を突触するのが好ましい。また、エフェクター分子に対する抗体上の結合部位における変性は、全体的な結合親和性の減性を実質的に必要としないが、幾何学的な相互作用を減え、エフェクターの順序を非生産的結合によって阻害するものとするところがあることも考えられる。さらに、またエフェクター機能は、エフェクター分子結合に直接に関連せず、エフェクター機能の発現に関連する部位を突触することにより減性してもよいと考えられる。

抗体のエフェクター機能を変性することにより、免疫反応の様々な面を抑制すること、例えば、免疫系の様々な反応を強化または抑制することが可能となり、診断および治療において有益な効果が得られる。

例えば、腫瘍および癌のガンなどのような幾つかの悪性性腫瘍を有する患者の悪性腫瘍の誘導的局在化(guided localization)をはかるためにモノクローナル抗体を用いることが知られている。しかしながら、これらの一般の用途は、

を越す。

変性抗体の産生は、新陳代謝に熟知の技術を含むいかなる適当な技術によって行なってもよい。例えば、C<sub>H</sub>2領域などの抗体の関連した定常領域の形成部位または全部など、抗体の適当なタンパク質配列は、適当な変性残基を含んで合成することができ、ついで抗体分子の適当な場所に化学的に結合することができる。

しかしながら、遺伝子工学の技術を変性抗体の産生に用いるのが好ましい。変性残基はいかなるこのような技術はつづのものからなる。

a) 適当な残基が変性されたIgG 重鎖のIgGのV<sub>H</sub>、C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2領域など、IgG H鎖またはH鎖の少なくとも一部をコード化するDNA配列には操作可能に結合した適当なプロモーターを含む第一の複製可能な表現ベクター(expression vector)を産生すること。

b) 必要により、相補的Ig L鎖またはH鎖をコード化するDNA配列に操作可能に結合する適当なプロモーターを含む第二の複製可能な表現ベクターを産生すること。

公認性、毒性並びに非特異的毒性のようないくつかの副作用が起っているため、限定されている。人体への内投与後、その副作用となる組織に到達する放射性同位素(または腫瘍結合(isotop associated)モノクローナル抗体)少量である(Epenetosら、1986年)。これらの研究における一つの問題として、正常なリンパ節における高い非特異的吸着、およびネズミモノクローナル抗体の速やかな異化が、また、ヒトモノクローナル抗体の使用は、リンパ管、肝臓および脾臓の高親和性レセプター(FcγR1)に対する非特異的結合のため高い背景レベル(バックグラウンド)を示すことがある。この高親和性レセプターに結合しないモノクローナル抗体は、抗体の特異的な腫瘍への取り込みを増大し、一方FcRへの非特異的結合により背景レベルを下げることにより抗体誘導(avid)腫瘍の局在化を改める。腫瘍の増殖に用いられるモノクローナル抗体は、一般的には放射性の標識がなされるか、ホスト自身のニフェーの順序の利用が行われる。単独腫瘍、特にK細胞によるDCは最も効果的と思われる(301系、1985年)が、抗腫瘍した細胞細胞によって生体内でこれらのいずれが最もであるかは未だ明らかでない。ある形式のFcレセプターに反応する抗体を産生することは可能である。例えば、B、Sの細胞の高親和性FcγR1を結合しない抗体は産生され得るが、従前に提案したとFcγR1を結合し、A<sub>2</sub>細胞を結合し、A<sub>2</sub>細胞および低親和性細胞の特異的増殖

クターを用いて培養培養された細胞系、プレパラティブ(preparative)ベクターを用いて培養培養された細胞系、およびそれらを産生する方法を含む。

好ましくは培養培養された変性抗体エフェクター機能性を産生する細胞系は、不死化した哺乳動物の細胞系でこれはミエローマ、ハイブリドマ、トリオマまたはドコモマ細胞系のごときリンパ系器官という利点を有すまた、該細胞系はエプスタインバーウイルスのごときウイルスを用いた培養培養により不死化されたB細胞など常なリンパ細胞からなってもよい。最も好ましくは該不細胞系はミエローマ細胞系またはその派生体である。

変性したエフェクター機能の抗体を産生するのに用いる細胞系は哺乳動物の細胞系であるのが好ましいが、培養系または酵母細胞系のごとき他のいかなる適当な宿主かわりに用いてもよい。特に、E. coli 誘導細胞系を用いることも考えられる。

正常状態にあるある種のミエローマ細胞系のごとき不したリンパ細胞系は、分離したIg L鎖を分泌すること

恒定的な鎖を分泌しない場合、ステップc)を実行する必要がある。このステップはステップb)において発生されたベクターをさらに操作することにより行なってもよく、その結果このベクターは異質だけでなく宿主をコード化する。別態としては、不死化した細胞系を形質転換するのに用いられる第二ベクターを産生することによりステップb)を実行する。

かかるベクターを産生し、不死化した細胞系を形質転換に用いられる技術は、当業者に公知であり本発明を構成するものではない。

不死化した細胞系が恒定的な鎖を分泌する場合において、形質転換された細胞系は例えばベクターを用いて適当な細胞の細胞を形質転換し、ついで該細胞の細胞を不死化した細胞系を用いてスフェロプラスト融合により融合して産生してよい。別態としてリトムを直接不死化した細胞系にエレクトロポレーション(electroporation)により導入してもよい。

抗体の関連抗原タンパク質をコード化するDNA配列は、オリゴヌクレオチド合成により産生してよい。別態として産生したタンパク質をコード化するDNAをプライマー-定方向オリゴヌクレオチド部位-定方向突然変異誘発により産生してもよい。この技術は本発明に既知点を含むDNAの一本鎖を用いて所定の配列に対してコードするオリゴヌクレオチドのハイブリッドを形成すること、および産品を含む鎖を産生するオリゴヌクレオチドの延長のために機能として一本

鎖を用いることを含む。この技術は、様々な形で記述されている[ZollerおよびSelik(1982年)、Zollerおよび984号)、Norris(1983年)、Krause(1982年)]

最も特異的な形態のこの技術は、様々な理由から高い精度で実行を許さない。M13に基づくベクター-単一および融合配列の両方を誘導する改良技術がC985a)により報告されている。

本発明は、異なる種、例えばヒト、げっ歯類(マウス、ハムスター)など、および他の種(class)の行うことができる。本発明はまた自然発生産品、4(例えばPCT/GB85/60332にて開示の形式の)他の方法(GB2168538にて開示の形式の)にて変性抗体に用いることができる。

一例として、IgGについてFcガンマR1とレセプターに結合する結合親和性を変える研究がなされ

ヒトおよびマウスにおいて、3種のFcガンマR1は部分的にFcガンマR1、FcガンマR1、FcガンマR1と呼ばれ、これらは全く異なって産生される細胞型(bone-marrow cell type)を産生する(およびLoney、1988年)。さらに、これらレセプターはIgGサブクラスに対して異なる親和性を持つ。前記のごとく、細胞表面のこれらのレセプターへの結合は数々の異なる多様な生物学的反応を引き起こすなどのレセプターがどの結果に対して主に反応するか

は知られていないが、これら恒定的な作用に対して関連する親和性レセプターであることが反応の形から推定される。ヒトおよびマウス中のレセプターは数々の発見的基準に基づき同族体として提案されている。両者由来の親和性FcガンマR1のクローニングおよび配列決定(sequencing)は、この仮説(Levyら、1986年)を支持する。高親和性レセプターFcガンマR1は巨噬細胞にわたり、かつヒトとマウスの両方の結合単量体IgG(ヒト-IgGおよびIgG3、マウス-IgG2a)について研究されており、同一の細胞型に発見される。

IgGのFc領域は、第1図に示すように二つの定常領域、C2およびC3からなる。マウス系を用いて、相互作用に対する二つの領域、Cガンマ3およびCガンマ3の互いの野の決定に多くの努力が払われた。分離されたC3領域(CpCフラグメント)は、免疫複合体の形成において阻害作用を示さないことが報告されている(Abrahamら、1976年)。しかし他の報告では、このフラグメントはFcガンマ

の能力は、親和性C3領域上の抗原決定基に向けらる結合したFcRと相互作用を行うが、C3上のRに結合していないものはC2領域上の結合部位と(Partridgeら、1983年)。

また、ヒト単量体FcガンマR1上のヒトIgGは高親和性レセプターの広範な研究において、FoxらはヒトIgGのC2領域に対する結合部位のを行ったWoodら、1984年; Partridgeら、1984年)から得られたIgGサブクラスの範囲はヒトのフラグメントと共に、直接結合生物学においてヒトIgGとヒト単量体との間の相互作用を明らかにその能力がテストされた。IgGはヒト単量体(FcガンマR1)に対して強い、中間のあるいは弱く示すものに分類された。このような異なる親和性のアミノ酸配列の比較により、ヒンジ結合領域(4-5-6-7-8)の潜在的な単量体結合部位が、1981-1982年により形成された二つのペプ

38) Leu-Leu-Gly-Gly-Proがマウスガンマ2b中のLeu-Gly-Gly-Proになることを示す。

結合親和性を調べる試みにおいて、G1u28のLeuによる置換がマウスIgG2bの可変域中に行われた。可変域中の残基の番号は、E.U.インデックスの番号である (Kabata, 1983年参照)。正常マウス抗体はヒトFcガンマR1に結合しないが、残基28をグルタミン酸からロイシンに例えば部位近方向変異誘発にて変えることにより、ヒトFcガンマR1に対する親和性は100倍以上増大する。親和性の増加の大きさは予想以上に大きく、この領域における単一のアミノ酸の置換が、ヒトおよび他の動物の生体内における適用領域に対してより適合した抗体抗体の生産に用いられることを示唆する。この置換は残基成分C1qなどの他のIg結合部位を活性しない。

また、特定の残基をその領域上の不適当な置換を有する遺伝子で置換することにより、あるいはG1uまたはAspなどの異なる官能基、あるいはPro、TyrまたはTrpなどの芳香族非極性残基などを導入することによりFcガンマR1結合の親和性を高めることが可能である。

これらの置換は、異なる免疫グロブリンの間の配列の相似性が得られたマウス、ヒトおよびラット系に対し等しく適用されると予想される。ヒトFcガンマR1レセプターを結合するヒトIgG3において、Leu235をG1uに置換す

ることは、レセプターに対する抗体の相互作用を破壊することによりこのレセプターの結合部位はスイッチオン、オフが行われる。

ヒンジ連結領域 (例えばA1aによる置換残基234、235または237) の置換または置換部位における置換 (残基234、235、236および237における置換とFcガンマR1レセプターに対する親和性に少なくとも影響を与えることを示す。

したがって、本発明の他の観点では、示唆抗体と比べてFcガンマR1に対する抗体結合親和性を付与した抗体抗体を有するクラスIgGの抗体抗体が提供される。

このような抗体は、残基234、235、236および237に置換を有するものが都合がよい。

他のFcレセプターに対する親和性は異なる方法において免疫反応を制御するなどの用途の方法で置換することができる。

さらに他の例として、抗体のC1成分の結合によるIgの凝集性を活性することも研究された。

抗体系、C1の第一成分は実際にはC1q、C1rおよびC1sとして公知の3種類のタンパク質からなり、これら強く結合している。C1qは8種のタンパク質結合体の1の結合に対して応答性を有することがわかった。

分離されたFcフラグメントはC1qとIgとの相互作用を阻害することがわかった (Vasconcelos, 1976年)。

また、C1qの結合はイオン強度に依存し、イオン相互作用が関連することがわかった。

Cn3領域をIg分子の他の部分から切り取ることが可能であり、Cn3領域の欠失によってC1q結合活性はなくなるということがわかった (Coloan および Porter, 1975年)。

Cn2領域をIgGから分離することも可能である。このような分離Cn2領域は分離したFcフラグメントと同様にC1qに対して同一の結合親和性を有することがわかった (Isenman, 1975年)。

このような結果からC1qに対する結合部位はIgのCn2領域に位置すると推定される。C1q結合に参与するCn2領域中の特定のアミノ酸残基を特定するために様々な試みがなされた。最初の手法では、Cn2領域の短い系分に対応する合成ペプチドがC1q結合の阻止のために試された。これによって二つの可能な結合部位が特定された (Bookle, 1975年およびLukas, 1981年)。

第二の手法では、数種のIgCn2領域の配列の比較が、その三次元構造の研究と共に行われた。この結果、C1q結

H領域中の残基の番号はE.U.インデックスの番号である (Kabata, 1983年参照)。

本発明者らは、以下に述べる特異的なC1q結合 (C1q) において、318 (G1u)、320 (Leu) および322 (Asp) のいずれか一つの残基をA1aに変えることにより結合をなくすることが可能であることを見いだした。

さらに、これらの残基において変異を起こさせることにより、残基318が水素結合形成を有し、かつ残基320および322の両者が正に侵襲された例を有するものが、結合が保持されることがわかった。

本発明者らは、これらの三つの残基はIgGのC1q結合に直接関連するのであると信ずる。しかしながら、これらの残基はC1qとの物理的接触には直接関係しない位である。これらの残基は一つのCn2領域が、IgG鎖中の側鎖領域に対して変換するのを補助し、この結果C結合にとり必要な少なくとも二つのIgG分子を産生。この場合、C1qは全く異なる領域中のIgGと相互作用してもよい。しかしながら、本発明者らはい

位置 818、320 および 322 は、糖基結合であるマウスおよびヒト IgG 中に高濃度に維持されることに注目すべきである。

また、3つの特定の残基の置換は C1q 結合活性を促進するだけで、抗原結合能力、プロテイン A 結合活性（プロテイン A は C<sub>H</sub>2/C<sub>H</sub>3 インターフェースに結合する）または Fc のマウスマクロファージへの結合能力は促進させないことがわかった。

本発明の方法は、3つの特定の残基のいずれか1つをその位置上の不適当な残基性を有する残基で置換することにより C1q 結合活性をなくすことに用いることができると確信する。A12 のみを有するイオン性残基を C1q 結合で置換する必要はない。また、C1q 結合をなくするため、3つの残基のいずれか1つの代わりに他の Glu、Ile、Leu または Val などのアルキル置換非イオン性残基、あるいは Pro、Tyr、Trp および Phe などの芳香族置換性残基を用いることも可能である。また、C1q 結合活性をなくするために残基 320 および 322（318 は除く）の代わりに Ser、Thr、Cys および Met のような極性非イオン性残基を用いることも可能である。

イオン性または非イオン性極性残基上の制約は Glu 残基により形成される結合と同様の方法で水素結合を形成することができる。したがって、極性残基による 318 (Glu) 残基の置換は修正されてよいが、C1q 結合活性をなくすこ

とはない。

さらに A12 による 207 (Asn) の置換はを除去し、一方 C1q に対する親和性を僅かだけ（約 1/3 に弱くなる）ことがわかった。これは 3 コレシド部位を破壊するためであり、かつ液体中に炭化水素の存在が必要であると考えられる。こける他の置換いずれもグリコシル化反応を破壊する

さらに、Lys 320 の Glu への置換は、C 結合性を正常型に比べ僅かだけ弱くすることが示され、これは良好な C1q 結合が溶解には不十分であり、Ile の正電荷配向が必要であることを示す。

現在までの全ての抗体イソタイプは、マウス I 体に移植する適合、C1q 結合要素 (notif) または結合に効果的な部位に関連した変換を受ける。明の決定因子が他に存在するはずである。例えば、および低セグメント濃度を有する抗体イソタイプ (O15、1984年) であり、(a) モチーフを C1q の相互作用は Pab ームによる C<sub>H</sub>2 の固定のために立体的にブロックされる (Leatherbarrow 年) か、または (b) C1q と抗体との相互作用のために正確な配向を必要としこのためそれ自体異なり、とすることが示唆される。

つぎに本発明を示す図面を参照し、実施例により、第 1 図は Ig の構造を示す。

第 2 図は変換した P<sub>0</sub> ガンマ R1 結合活性の抗体を生成するために用いるクローニングステップの手順を示す。

第 3 図はマウス IgG ガンマ 2b 遺伝子の配列を示す。

第 4 図は U937 上の高親和性レセプターに対してマウスガンマ 2b 免疫グロブリンを用いて結合した<sup>125</sup>I にて標識したプール (pooled) ヒト IgG の阻止を示すグラフである。

第 5 図は U937 高親和性レセプターに結合した<sup>125</sup>I-DL285 のスクラッチャードプロットである。

第 6 図はヒトガンマ 3 遺伝子のヌクレオチド配列およびタンパク質配列を示す。

第 7 図は変換を有するマウス IgG 2b 抗体の C<sub>H</sub>2 領域をコード化するオリゴヌクレオチド配列、および残りの変換変異体を構成するために用いられるオリゴヌクレオチドの配列を示す。

つぎにヒト P<sub>0</sub> ガンマ R1 に対するその親和性を変換するマウス IgG 2b に関する実験について述べる。

抗体の可変および定常領域エクソンをコード化する DNA は、*in vitro* で操作し、リンパ細胞系中に再導入することが

な領域をコード化する。このベクターを用いて抗体はヒト P<sub>0</sub> ガンマ R1 に結合しない。

pSV-VNP 2b ベクターの構造の一部を示す。図 2(b) 図に示すごとく、各ベクターは、用いて部分的に塩化され、C<sub>H</sub>2 および C<sub>H</sub>3 の両方フラグメントはプラスミド M18K19 (Carte a) にクローンされる。

C<sub>H</sub>3 領域の N 末端の Ser1 部位は、この N 末端配列を保持したオリゴヌクレオチドを用いた変換変異誘発により除去された。

ついで、C<sub>H</sub>2 領域における点変異は、第 3 図に示される 69775 図および塩基 DL285 にて変換にて合成オリゴヌクレオチドを用いて生ずる。変異の構造は以下に述べる。点変異の濃度は第 2 (す。

変異 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 フラグメントは pSV-VNP5 クター中にクローンされ、正常型 C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 を有する。変異体 pSV-VNP 2b ベクターは、J



抗原抗体反応235は、ヒトIgGの結合の抑制およびヒト単球細胞への直接結合により検定される(Forstら、1984; 1986)。ヒト単球細胞系、U937上の高親和性Fcγセプターへの抗原体の<sup>125</sup>Iで標識した正常ブールヒトIgGの結合の抑制は、定量的な放射能学的検定システムにて測定され、ここで遊離あるいは固相結合標識は水-非潤和性オイルを用いて遠心分離により分離された。正常型ガンマ25および抗原抗体235の結合は、微沈したポリクローナルヒトIgGの結合により比較される。第4図はこの実験の阻止曲線を示す。第4図において白丸は正常型を示し、黒丸は抗原抗体235を示す。結果は阻害剤(inhibitor)の存在下に<sup>125</sup>I-IgGの結合分率=1となるよう標準化した。抗原抗体はヒトIgG1の結合を阻止し、正常型のタンパク質は阻止活性を有さなかった。放射能標識した抗原抗体235のU937細胞への直接結合は、結合定数 $3.13 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ を与え(第5図)、同様の阻害のブールヒトIgGの値と非常に近似的である。

第5図はU937高親和性Fcγセプターに結合する<sup>125</sup>I-E1235の典型的なスキャッチャードプロットである。細胞のセル当たりの<sup>125</sup>I-E1235結合のセル数、rはつぎの関係式を用いて計算した。

$$r = \frac{5 \times 10^{12} \times \text{IgG 25}}{\text{細胞の数} \times L}$$

式中、IgG25は結合<sup>125</sup>I-E1235の濃度である。

第1表

	<u>1<sub>50</sub> (36)</u>
正常型 (Leu234, Leu235, Gly236, Gly237)	10 <sup>10</sup>
抗原抗体	
A1234	4 × 10 <sup>10</sup>
G1235	10 <sup>10</sup> 組
A1236	8 × 10 <sup>10</sup>
A1237	3 × 10 <sup>10</sup>

上記の表は1<sub>50</sub>(即ち、<sup>125</sup>Iで標識したブールヒトIgGの結合分率が0.5におけるIgG3の濃度)の既知を示す。

これらの結果は前記のごとく、診断および治療においてマウスおよびヒトの両抗体の使用に関し重要な意味を持つ。

この結果はFcγガンマR1セプターが選択的にスイッチオンまたはオフされることを示し、これは人および他の動物の*in vivo*の診断または治療に用いられる抗体の標識に大いに用い得ることを示す。

Aは遊離の<sup>125</sup>I-E1235の濃度をあらわす。プロの相関関係は0.95であった。

このように抗原抗体は、ヒトFcγガンマR1に対するIgG25の結合親和性を100倍向上させる。

抗原はヒトガンマ3遺伝子下にて行われ(Duckら、1971)ind<sup>+</sup>SPH1フラグメントは、BamHIリンカ付着した後、最終にM13 mp10内にサブクローニングした。ついで、合成オリゴヌクレオチドが前記のごとく0.1第6図に示すごとく変異:

234 LeuからA12

235 LeuからG12

236 GlyからA12

237 GlyからA12

を形成した。

BamHIフラグメントは、B18抗体の可変領域にコード化するHindIII-BamHIフラグメントに付着し(Kuberserら、1984および1985に記載)、pSVgベクター中に発現するようにクローニングされる。

FcγガンマR1における結合の阻害抗体の性質は、図に関連して述べたように融合後定着(cooperation)にて関連的に決定した。第1表は<sup>125</sup>Iで標識したブールヒトIgGの結合を阻止するに必要な抗体のU937細胞に対する濃度を示す。

得られた抗体の典型的なNIP-アケファリン誘導と赤血球(Altmanら、1984年)を凝集する能力は定量的に免疫学的検査法(Forstら、1986年)により測定した。定結果を第2表に示す。 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗体で凝集した力価は0分後37℃における60%凝集に要する抗体の量を示す。

抗原抗体の数は、NP-Affingel上の次NP抗体を凝集させた後、放射能標識C12に対する凝集で試験した(LeatherbarrowおよびDuck、1984年)。この結果も第2表に示す。

第2表

IgG	力価(μg/ml)	親和性αM
Mo1gG2b	9	10
Mo1gM	0.15	-
Mo1gG1	x	-
Mo1gG2bの無関係な変異体		
Pro331-A1a	3	-
Pro331-Gly	-	12
Glu338-A1a	3	12
Thr335-A1a	3	10
Ser337-A1a	3	11
Glu283-A1a	3	-
His285-A1a	3	12
His290-A1a	3	11
Glu294-A1a	3	-
Glu236-A1a	3	-
Lys248-A1a	3	-
Ile253-A1a	3	9
Ser267-A1a	3	-
Asp270-A1a	3	-
Glu274-A1a	3	-
Lys317-A1a	3	-
Lys336-A1a	3	-
Lys340-A1a	3	-

溶菌活性をなくすMo1gG2bの変異体

Glu318-Val	x
Glu318-Ala	x
Lys320-Ala	x
Lys320-Gln	x
Lys322-Ala	x
Lys322-Glu	x
Asn297-Ala	x

溶菌活性を保持するMo1gG2bの変異体

Glu318-Thr	3
Lys320-Arg	3
Lys322-Arg	3

ヒトIgG1およびマウスIgG1に付着する1有する抗体は、各々ニム、ブルグマン博士(M. R. およびピーティ・ジョーンズ氏(P. T. Jones)よりいただいた。

変異体Glu318-Ala、Lys320-Glu、Lys322-Alaは劇的に親和性が減少したしかしながら、これらはNPハプテンおよびプロラ結合を保持する(Cα2-Cα3インターフェイスで)。このことから、C1q結合の損失は抗体の濾過作用因ではないことが示唆される。隣接残基(Glu318)または遠隔の残基(Ile253-A1a)親和性を保持する。

この結果から残基318、320および322により定義された表面パッチは、IgGがC1qと相互に作用するか否かを決定することが示唆される。これらの残基はヒトおよびマウスIgGに高度に保守され、これら3箇所における側鎖の酸性は、補体を活性化しないか、または補体に対する強化された親和性を有するヒトC3b変換の産物と結合して有用に組み立てるために用い得ることがわかる。

この表面パッチがC1qに対する完全な結合部位である証拠は、Glu×Lys×Lys変異を含むポリペプチド合成品から判明し、該変異はモデル系中のC1q結合を阻止することがわかる。この研究は本出願と同日付にて提出の発明の名称「補体結合ペプチド」として特許係属中のリサーチ・コーポレーションによるPCT出願第 号に記載されている。

本発明は素に説明のために上記のごとく記載されたにすぎず、変異および変更は本発明の範囲を逸脱しないかぎり可能であることがわかる。

## 参考文献

- アブラムソン、エヌ、ゲルファント、イー、ダブヤンドル、グエイ、エイチ、およびローゼン、エフ (Abramson, E., Gelfand, E.W., Jandl, J.H., et al.), 1970年, J. Exp. Med. 132巻, 1
- アンダーソン、シー、エル、およびルーニイ、アイ (Anderson, C.L. and Looney 2.), 198 Immunol. Today, 7巻, 264頁
- バーネット-フォスター、ディー、イー、ドークレイ、グエイ、およびペインター、アール、エイチ (Barnett-Forster, D.E., Harrington, K.J., and H.U.), 1980年, J. Immunol. 124巻, 2
- ゴーツルム (Goetz et al.), 1975年, No 82巻, 742-749頁
- ブルンハウスおよびセブラ (Brunhouse and Sebra) 1979年, Molec. Immun. 16巻, 907-911
- バートン (Burton et al.), 1980年, Nature

ーク、アール、ステルンベルグ、エム、ジュイ、イー、お  
よびドクエット、アール、エイ、(Burien, D.R., Boyd, J.,  
Brantford, A., Satterbrook-Smith, S., Gennet, S.J., E  
ovlas, J., Radoscher, T.R., van Schravendijk, J.R.,  
Stiersberg, N.J.B., and Dact, B.A.), 1980年、Nature,  
288巻、338頁

カーター、ピー、ベドール、エイチ、および ウィンタ  
ー、ジー、(Carter, P., Bedouelle, H., and Winter, G.),  
1985年、Nucleic Acids Res, 13巻、4451~4  
48頁

カーター、ピー、ベドール、エイチ、ウエイ、エム、  
ワイ、およびウィンター、ジー、(Carter, P., Bedouelle,  
H., Way, M., and Winter, G.), 1986年、In:  
Oligonucleotide-site-directed mutagenesis in M13.  
Anglian Biotechnology Limited, Colchester, England.

コロンおよびポーター (Colomb and Porter), 1975  
年、Biochem J, 145巻、177~183頁

ダンカン、エイ、アール、(Duncan A.R.), University  
of Cambridge Ph.D Thesis (to be published).

エベリトス、エイ、スナック、ディー、ダーバン、エ  
イチ、ジョンソン、ピー、およびテイラーパパディミトロ  
ー、ジュイ、(Epenetos, A., Snook, D., Durbin, R., Joh  
nson, P., and Taylor-Papadimitrakou, J.), 1986年、  
Cancer Res, 46巻、8188頁

レザーバロウ、アール、ジュイ、レイドメイチャー、ティ  
ー、グザリュー、デック、アール、エイ、ウーファ、ジニ  
イ、エム、クラーク、エイ、パートン、ディー、アール、  
リチャードソン、エム、およびファンスタン、エイ、  
(Leatherbarrow, R.J., Radoscher, T.R., Gek, R.A.,  
Boof, J.W., Clark, B., Burton, D.R., Richardson, K., a  
nd Feinstein, A.), 1985年、Molec Immun, 22巻、  
407~415頁

ルイス、ブイ、エイ、ロック、ディー、ブライトナー、  
エイチ、およびメルマン、アイ、(Lewis, P.L., Koch, T.,  
Plotner, D., and Hoffman, J.), 1983年、Nature,  
304巻、372頁

ルカスら (Lucas et al.), 1981年、J. Immun,  
127巻、2555~2560頁

ムリガン、アール、シー、およびバーク、ピー、  
(Mulligan, R.C., and Berg, P.), 1981年、Proc,  
Natl. Acad. Sci. USA, 78巻、2073頁

ニューバーガー、エム、エス、およびウィリアムス、ジー、

ヘイル、ジー、クラーク、エム、およびウエルドマン  
エイチ、(Hale, G., Clark, B., and Feldmann, H.), 1  
983年、Immunol, 1134巻、3056頁

ヘイル、ジー、およびウエルドマン、エイチ、(Hale,  
and Feldmann, H.), 1985年、In Hybridoma Technolo  
gy in the Biosciences and Medicine, T. Springer, ed.  
Elsevier Press, New York.

フーバー、エイチ、およびフーテンベルグ、エイチ、エ  
イチ、(Huber, H., and Fudenberg, H.H.), 1986年、J  
Arch. Allergy Appl. Immunol, 34巻、18頁

ハックら (Hack et al.), 1985年、Muc. Acids R  
14巻、1779~1788頁

アイゼンマンら (Issanen et al.), 1975年、J. Im  
114巻、1728~1729頁

ケイバットら (Kabat et al.), 1980年、"Sequence  
of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Heal  
and Human Services.

キョロフエノ、エイチ、ピー、およびエペネイト、エイ  
(Khalafon, E.P., and Epenetos, A.), 1986年、Canc  
Treatment Reviews, 13巻、249頁

クレイマーら (Kramer et al.), 1982年、Muc.  
Acids Res, 10巻、8475~8485頁

レザーバロウ およびデック (Leatherbarrow and Deek),  
1984年、Molec Immun, 21巻、321~327頁

イチ、(Kouberger, B.S., Williams, G.T., Mitchell, E.,  
Jouhal, S., Flanagan, J.C., and Hobbitts, T.U.),  
1986年、Nature, 314巻、288頁

ニューバーガー、エム、エス、ウィリアムス、ジー、  
ー、およびフォックス、アール、オー、(Newberger, M.S  
Williams, G.T., and Fox, R.O.), 1984年、Nature  
312巻、804~808頁

ノリスら (Norris et al.), 1983年、Muc. Acids  
Res, 11巻、5109~5112頁

オイ、ブイ、ディー、ミナーキング、ディー、ハーデ  
アール、アール、レイドラー、ジュイ、ダンブル、リ  
イ、エム、ハーゼンベルグ、エム、エイ、およびストラ  
(Qi, V.T., Minh-Vuong, T., Hardy, R.H., Reidler, J.  
Bang, J.L., Herzog, L.A., and Stryer), 1984年  
Nature, 307巻、136~140頁

パートリッジ、エム、ジュイ、ワーフ、ジュイ、エム  
ジュフェリー、アール、およびパートン、ディー、アール  
(Partridge, L.J., Boof, J.W., Jefferies, R., and Burt

(Ravetch, J.V., Luster, A.D., Reinherz, R., Kochan, A., Pavlov, S.I., Portnor, J., Nulenz, J., Pan, Y.W., C., Babelow, J.), 1986年, Science, 234巻, 718頁

サグス, エス, ブイ, ハイローズ, ティー, ミヤケ, ティー, カワシマ, イー, ユイチ, グンソン, エム, ジェイ, イタクラ, ケイ, およびウーレイス, アール, ビー, (Suggs, S.V., Hirose, T., Hirake, T., Sawashima, E.H., Johnson, B.J., Ishida, K., and Fallice, R.B.), 1981年, in: Developmental Biology using Purified Genes (D. Brown, ed.) Academic Press, New York.

ウェルゼンら (Wellstein et al.), 1984年, Molec. Immunol., 21巻, 801頁

ワーフ, ジェイ, エム, ジェファー, エム, アイ, ジェフェリー, アール, およびパートン, ティー, アール,

(Roof, J.M., Jaffar, M.J., Jafferis, B., and Burton, D.R.), 1984年, Molec. Immun., 21巻, 629頁

ワーフ, ジェイ, エム, パトリッジ, エル, ジェイ, ジェフェリー, アール, およびパートン, ティー, アール, (Roof, J.M., Partridge, L.J., Jafferis, B., and Burton, D.R.), 1986年, Molec. Immun., 23巻, 319頁

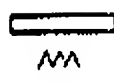
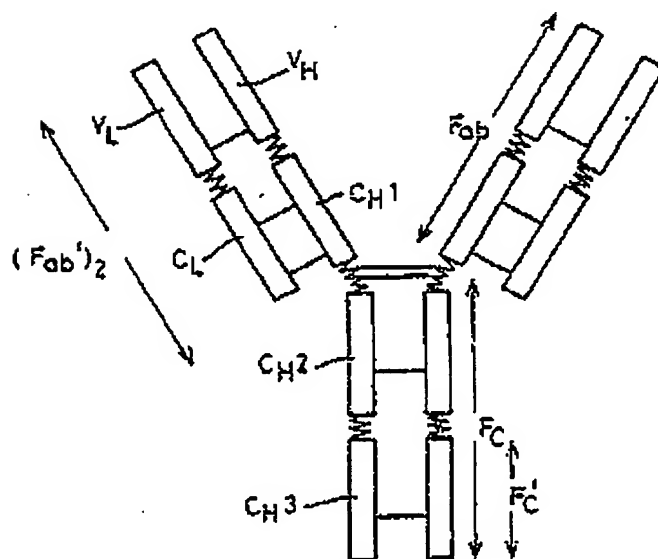
ヤスミンら (Yasmeen et al.), 1976年, J. Immunol., 116巻, 518-522頁

ヤングら (Young et al.), 1986年, Anal. Biochem.,

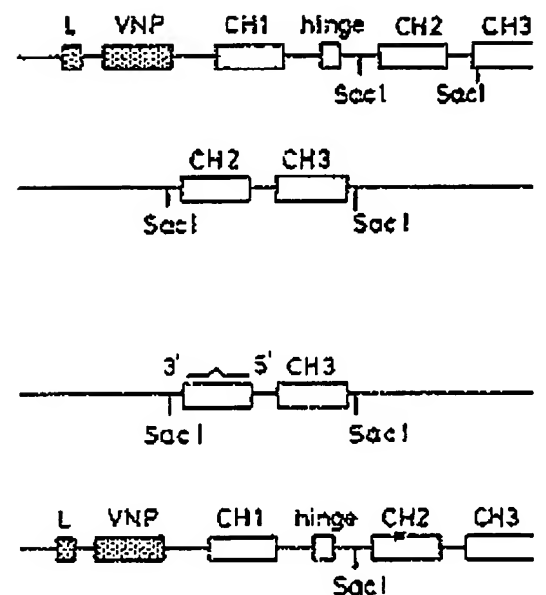
154巻, 649-656頁

ゾラーおよびスミス (Zoller and Smith), 1982: Nuc. Acids Res., 10巻, 6487-6500頁

ゾラーおよびスミス (Zoller and Smith), 1986: DNA, 9巻, 497-488頁



領域  
領域間部



[illegible][illegible]

Fig. 3B

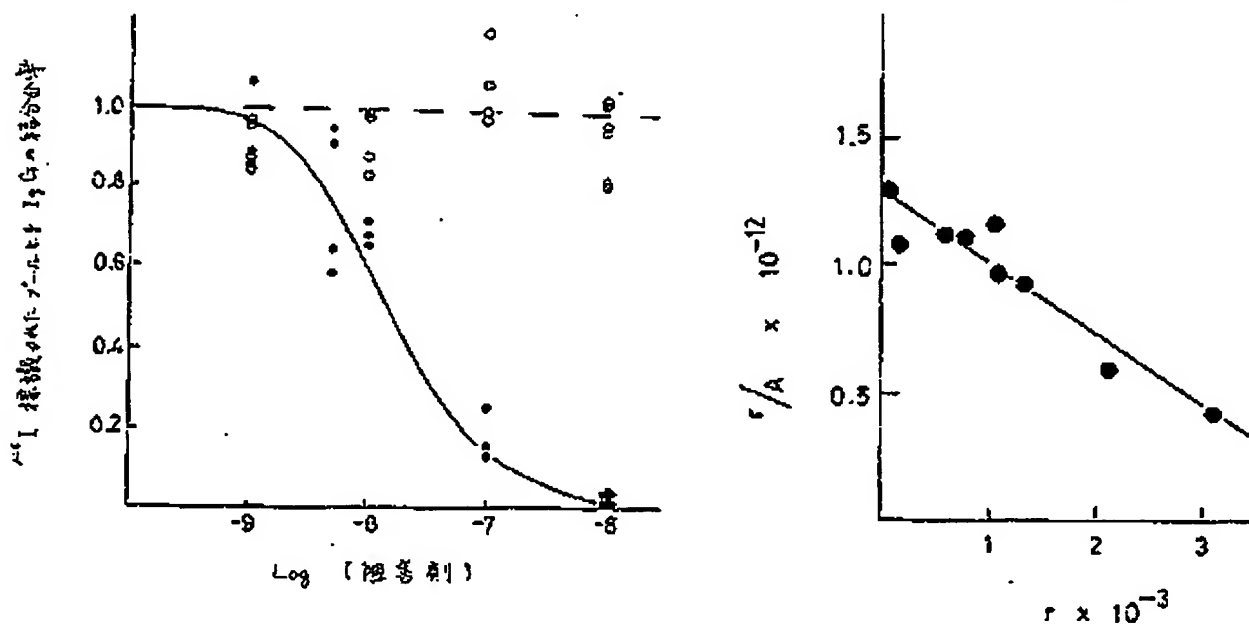


Fig. 4

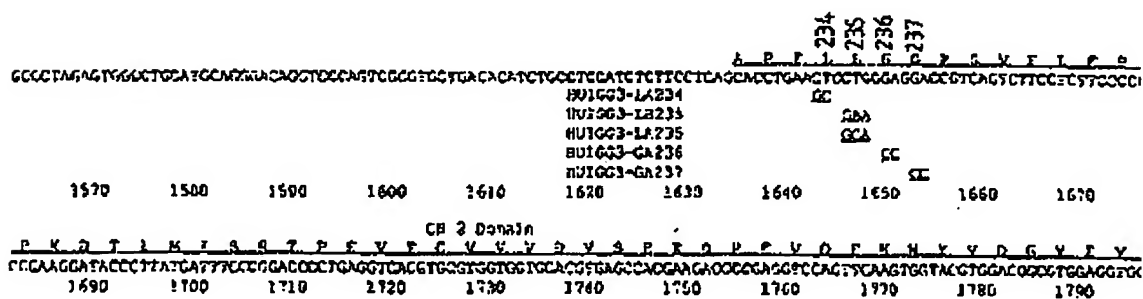


Fig. 6

附 錄 四 告 白

359

3' ATCTGTTCT

উদ্ভিদাংশ ১৫' ১১-২৫৩-৯।৫

297

3-TELEPHONE RECORDS 9-AS-257-A18

3' CGTCAGCGGRCGTTC 5' Lys920-Ala

3' [TTCGCGGCTGCTTCTG] 5' Lys322-Arg

SECRET 5' 614333-910

2- [GGTPOC44TFTTFA] S- 86-527-A1a

Fig. 7

[illegible]

Document ID: PST/ST 28/00213

11	DISBURSEMENT OF EXPENSES FOR TRAVEL (Continued from Form 1000-10)	Date of Disbursement
12	Name of Disbursing Officer (Print Name and Signature)	Date of Disbursement
	<p>globular permitting antiretroviral application. II. Effect on Fe-mediated effector functions", see page 425, Abstract 86345v, &amp; VmC Supp. 1983, 95(2), 134-49</p> <p>---</p> <p>Nature, volume 332, 7 April 1968.</p> <p>A.R. Duran et al.: "Localisation of the binding site for the human high-affinity Fe receptor on IgG". pages 563-564</p> <p>-----</p>	

第1頁の続き

④Int. Cl. 4

識別符号

序内整理番号

C 07 K 15/12  
C 12 N 15/00

8318-4H  
A-8717-4B

優先権主張

④1987年8月10日④イギリス(CB)④8718897

④1987年12月1日④イギリス(CB)④8728042

④発明者

バートン, デニス・レイモンド

イギリス、エス・10、シェフィールド カーシック  
ド、41